

COPYRIGHT: 1991, JPO & Japio

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

03005495

January 11, 1991

MODIFIED PHOSPHORAMIDITE PROCESS FOR PRODUCING MODIFIEDNUCLEIC ACID

INVENTOR: SELIGER HEINZ-HARTMUT; BERNER SIBYLLE; MUEHLEGGGER KLAUS; VON DER ELTZ HERBERT; BATZ HANS-GEORG

APPL-NO: 02132429

FILED-DATE: May 22, 1990

PRIORITY: May 24, 1989 - 89 3916871, Germany (DE)

ASSIGNEE-AT-ISSUE: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

PUB-TYPE: January 11, 1991 - Un-examined patent application (A)

PUB-COUNTRY: Japan (JP)

IPC-MAIN-CL: C 07H021#4

IPC ADDL CL: G 01N033#50

CORE TERMS: nucleotide, formula, detectable, sequence, modified, compd

ENGLISH-ABST:

NEW MATERIAL: A nucleotide sequence represented by formula I [wherein K is H, nucleotide, etc.; J is an OH group, nucleotide, etc.; B is a (modified) nuclear base; T is H, a lower alkyl, azide, etc.; X is O or S; L is a (n+1) valent crosslinking group; U is O, S, N or N-H, n is 1- 200, W is a detectable group or a group changeable to the detectable group].

EXAMPLE: 5'-O-dimethoxytrityl-2'-deoxythymidine-3'-O-[2-(9- fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]-N,N-diisopropylamino-phosphone.

USE: A reagent for producing modified nucleic acid.

PROCESS: For example, a nucleotide sequence represented by formula II is reacted with a compd. represented by formula Y-W (wherein Y is a reactive group) (e.g. 2-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl-N, N-diisopropylamino-phosphochloridite] to obtain the compd. represented by the formula I.

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-5495

⑬ Int. Cl.⁹

C 07 H 21/04
G 01 N 33/50

識別記号

Z
P

庁内整理番号

7822-4C
7055-2G

⑭ 公開 平成3年(1991)1月11日

審査請求 有 請求項の数 12 (全15頁)

⑮ 発明の名称 修飾された核酸を製造するための修飾されたホスホルアミダイト法

⑯ 特 願 平2-132429

⑰ 出 願 平2(1990)5月22日

優先権主張 ⑱ 1989年5月24日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P 39 16 871.9

㉑ 発 明 者 ハインツ・ハルツム・ドイツ連邦共和国7915エルヒンゲン-タルフインゲン、ハ
ト・ゼーリゲル

㉒ 発 明 者 シビレ・ベルネル ドイツ連邦共和国8900アウグスブルク、ゲーテストラッセ
62番

㉓ 出 願 人 ベーリンガー・マンハ イム・ゲゼルシャフト・ドイツ連邦共和国6800マンハイム31、ザントホーフアース
ト・ミット・ベシュレ
ンクテル・ハフツング

㉔ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名
最終頁に続く

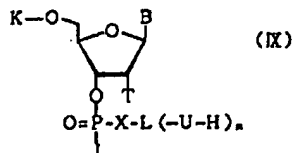
明 細 書

1. 発明の名称

修飾された核酸を製造するための修飾されたホ
スホルアミダイト法

2. 特許請求の範囲

(1) 式(IX):



[式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもし
くはヌクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン
原子であり、

Yは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチ
ドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子
であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、
低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であ

り、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、(n+1)価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN
-Hであり、

nは、1~200の自然数である]

で示されるヌクレオチド配列を、式(IV):



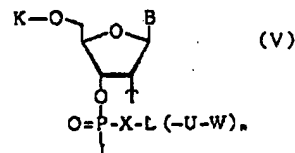
[式中、

Yは、反応性基であり、

Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化
し得る基である]

で示される化合物と反応させることを特徴とする、

式(V):



[式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもし

くはヌクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、 $(n+1)$ 価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化し得る基であり、

nは、1~200の自然数である]

で示されるヌクレオチド配列の製造方法。

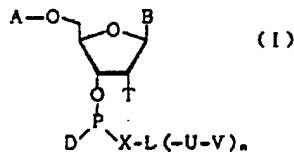
(2) 式(V):

し得る基であり、

nは、1~200の自然数である]

で示されるヌクレオチド配列。

(3) 式(I):



[式中、

Aは、酸素原子保護基、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドであり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

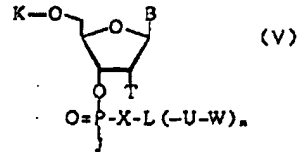
Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、 $(n+1)$ 価の架橋結合基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基または所望により保護されたヒドロキシル基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、



[式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、 $(n+1)$ 価の架橋結合基であり、

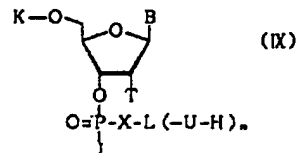
Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化

nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である]

で示される化合物を、遊離5'-ヒドロキシル基を有する別のヌクレオチドと反応させ、ついで生成したヌクレオチド配列を酸化することを特徴とする式(IX):



[式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

り、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

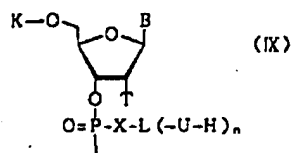
Lは、 $(n+1)$ 価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

nは、1~200の自然数である]

で示されるヌクレオチド配列の製造方法。

(4) 式(IX):



[式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Lは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基、または所望により保護されたヒドロキシル基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、

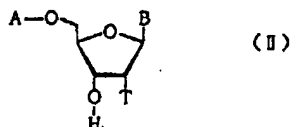
nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である]

で示されるヌクレオシドホスホルアミダイト。

(6) 請求項2に記載の式(V)で示される化合物製造用の請求項5に記載の式(I)で示されるヌクレオシドホスホルアミダイト。

(7) 式(II):



[式中、

Aは、酸素原子保護基、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドであり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

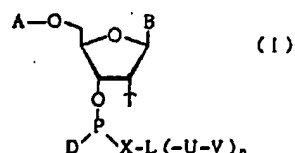
Lは、 $(n+1)$ 価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

nは、1~200の自然数である]

で示されるヌクレオチド配列。

(5) 式(I):



[式中、

Aは、酸素原子保護基、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドであり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

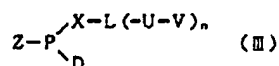
Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、 $(n+1)$ 価の架橋結合基であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基、または所望により保護されたヒドロキシル基である]

で示される化合物を、式(III):



[式中、

Zは、良好な離脱基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、少なくとも2価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

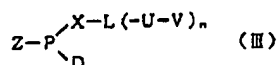
Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である]

で示されるホスファンと反応させることを特徴とする請求項5に記載の式(I)で示されるヌクレオシドホスホルアミダイトの製造方法。

(8) 式(III):



[式中、

Zは、良好な離脱基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、少なくとも2価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である]

で示されるホスファン。

(9) 式(VI):



[式中、Zは良好な離脱基である]

で示される化合物と、式(VI):



[式中、Dは第2アミン残基である]

で示される第2アミンとを反応させ、得られた生成物を、式(VI):

Jは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

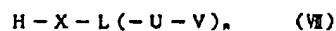
Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

X、L、U、Wおよびnは、上記定義と同じである]

で示されるヌクレオチド配列に対して本質的に相補的であるヌクレオチド配列検出用の核式(V)で示されるヌクレオチド配列。

(11) 試料DNAに対して相補的である核酸として、請求項2に記載の式(V)で示されるヌクレオチド配列を含むことを特徴とする試料に対して本質的に相補的である核酸と接触させることによる試料中の核酸の検出試薬。

(12) 二重鎖核酸の酵素合成におけるプライマー用の式(V):



[式中、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、(n+1)価の架橋結合基であり、

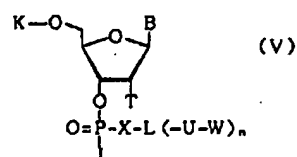
Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1~200の自然数である]

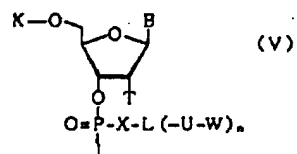
で示される化合物と反応させ、得られた生成物を単離することを特徴とする請求項8に記載の式(III)で示されるホスファンの製造方法。

(10) 式(V):



[式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、



[式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

X、L、U、Wおよびnは、上記定義と同じである]

で示されるヌクレオチド配列。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、修飾された核酸を製造するための修飾されたホスホルアミダイト法およびこの方法に用いる新規な化合物に関するものである。

(従来の技術)

核酸は、世界中の生命にとって基本的に重要であり、したがって、全ての生物中に存在している化合物である。遺伝情報は、その核酸中に蓄積される。核酸配列が個々の生物について特徴的であるので、該核酸は、異なる種の生物の区別および固定に関する規準でもある。したがって、核酸の合成および検出が多く試みられてきた。

核酸は、化学的または酵素的に合成することができる。自然に生じるβ配置の核酸の化学合成によると、定義されたヌクレオチド配列を有する、該核酸を大量に製造することができるので、近年、該化学合成は一層多く増加してきている。該化学合成は、特に、β配置のオリゴヌクレオチドの合成について、行うことができる。別の方法は、使用するヌクレオチドビルディングブロックのタイプおよび配列中の隣接するヌクレオチドに結合さ

よって行われるべきであり、簡単な方法で、例えば低沸点を有する溶媒(例えば、ジクロロメタン)を用いてシリカゲルによって行うことはできない。

生成物が多くの有機溶媒に不溶であるという欠点は、ホスホトリエステル法によって回避される。

ホスホトリエステル法では、反応性を1つだけ有し、リン原子の隣の2つのヒドロキシル基が異なる保護基で保護されているリン酸誘導体が用いられる。第1のヌクレオシドとの反応の後、保護基のうちの1つを開裂し、次いで、形成されたヒドロキシル基を、第2のヌクレオシドとの反応のために活性化することができる。この方法の結果、活性化されたヌクレオシドホスフェートの収量を減少させる2つの追加の反応工程を、ヌクレオシドホスフェートにおいて行うことが必要である。

比較的高価な合成ビルディングブロックにおいて、より少ない反応工程で操作される特に優れている方法は、ホスホルアミダイト法として知られている[ゲイト、エム・ジェイ(Gait, M. J.)等、オ

せる反応工程によって区別することができる。

ホスホジエステル法では、カップリング試薬、例えばトリアルキルアリルスルホン酸塩化物と共に、リン酸エステル残基以外の全ての反応性基が保護されているヌクレオシドリン酸を、反応を起こすべきヒドロキシル基以外の全ての反応性基が保護されている別のヌクレオシドと反応させる。主として、オリゴヌクレオチド鎖を構築する縮合工程中に、内部ヌクレオチド(リン酸エステル)結合の非エステル化OH基において望ましくない副反応が生じ、複雑な反応混合物となるために、この方法における収率は低い。さらに、形成されたリン酸ジエステルは、いくつかのプロトン性溶媒にだけしか溶解することができず、該溶媒中でエステル化を行わなければならないという大きい欠点を有している。ビリジン、ジメチルホルムアミドまたはジメチルスルホキシドのような溶媒は、例えば、沸点が高いというような周知の欠点を有している。ホスホジエステル誘導体の極性特性の結果として、単離および精製は、イオン交換体

リゴヌクレオチド・シンセシス: ア・プラクティカル・アプローチ(Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach)、[R L プレス(Press) オックスフォード(Oxford)]。この方法では、リン酸誘導体ではなくむしろ亜リン酸の誘導体、いわゆるホスホルアミダイト(phosphoramidite)が用いられる。以下の基:

- 第1のヌクレオシドと結合することができる反応性基、例えばハロゲン原子、
- 活性化の後に第2のヌクレオシドとの結合を行うことができる第2アミノ基、
- 保護基によって遮蔽されたヒドロキシル基を3価のリン原子に結合させる。

ホスホルアミダイト法の第1工程において、亜リン酸誘導体と、第1のヌクレオシドとを反応させる; この工程において、該ヌクレオシドは、反応性基を置換する。第2工程において、第2アミノ基を第2のヌクレオシドによって選択的に置き換える。該第2工程では、活性化試薬として、通常、テトラゾールが用いられる。次の工程におい

て、このヌクレオチド配列を、例えばヨウ素を用いて酸化し、保護基を開裂除去する。1つの変法としては、ホスホルアミダイト法が固相法として開示されている。この変法では、成長するヌクレオチド配列を固相に結合させる。過剰の合成試薬およびビルディングブロックの分離ならびにオリゴヌクレオチド配列の精製は、この方法によって非常に簡素化される。市販の入手可能な自動核酸合成器は、この方法に従って作動する。これらの構造は、例えば、ホスホルアミダイト法の特定の工程に適合している。

特に、生物学的試料中のDNAの特異的な検出に、既知のヌクレオチド配列を有する核酸を適用している。

このような検出法では、ある核酸と別の核酸の一重鎖が互いに相補的であるヌクレオチド配列を有しており、両者がリボースのC-1で同一の配置(α または β)を有している場合には、ある核酸の一重鎖が別の核酸と反応して、二重鎖を形成することができるという性質を利用している。

核酸を用いて核酸の量を測定する方法は、あまり感受性が強くない。

したがって、EP-A 0173251において、完全な核酸の塩基が化学反応によって修飾されることが示唆されていた。しかし、このために、いくつかの核酸の反応工程が必要であり、修飾の割合は、核酸が遊離アミノ基を含む塩基を含有しているか否かに依存しており、この修飾は、相補的核酸とハイブリグイズする能力を損なわない。

ジェゲル(Jäger)等[バイオケミストリー(Biochemistry)、第27巻、第7237頁、1988年]には、リン原子に修飾を有するジヌクレオチドの製造が記載されている。該修飾は、リンカーを介して結合している第1アミノ基からなっており、通常のホスホルアミダイト法と類似の方法に導入される。

しかし、この方法は、ホスホルアミダイトを使用する通常の自動合成器では行うことができない。他の欠点は、遊離アミノ基が、これに使用する求電子試薬と反応するので、もはや追加のヌクレオチドと結合し得ないということである。

自然に生じる核酸は塩基類および糖類の結合に関して β 配置を有しているので、特に、 β 核酸は、相補的核酸として考慮され得る。この二重鎖形成方法は、ハイブリダイゼーションと称されている。

修飾された一重鎖の相補的核酸を、一重鎖核酸とのハイブリダイゼーションに用いると、二重鎖の形成を検出することができる。その後、例えば放射性標識であってもよい修飾によって、ハイブリグイズされた核酸の量を測定する。

修飾された核酸の合成に関して、既に入手可能である天然の核酸を化学的もしくは酵素的に修飾することができるか、または既に修飾されたヌクレオチドビルディングブロックの助けによってヌクレオチド配列を合成することができる。

しかし、例えば、WO 86/07363において5'-末端について示唆されているように、既に完全に合成された核酸の末端を修飾することによって、一重鎖あたり修飾されたヌクレオチドを1つだけ含む核酸を製造することができる。したがって、プローブとしてこのタイプの修飾された

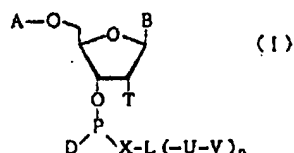
したがって、入手可能な従来技術の方法は、それぞれ、かなりの欠点を有している。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、既知の方法の欠点を回避すること、さらに詳細には、高い収率を有し、いくつかの反応工程において簡単な出発物質で行うことができるリン酸エステル残基の位置で修飾された β 配置の核酸の固相上における合成方法を利用可能にすることを目的とするものである。

(課題を解決するための手段)

本発明は、ヌクレオシドホスホルアミダイトを、遊離ヒドロキシル基を有する別のヌクレオチドと反応させ、ついでリン酸エステルに形成されるヌクレオチド配列を酸化することを特徴としており、該ヌクレオシドホスホルアミダイトとして式(1):



[式中、

Aは、酸素原子保護基、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドであり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、 $(n+1)$ 価の架橋結合基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、N、低級アルコキシ、または所望により保護されたヒドロキシル基であり、

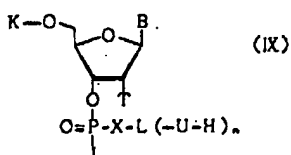
Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である]

で示される化合物を使用する、式(IX):



【式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもし

第67巻、第673頁~第684頁によって、本質的には知られている。本発明の方法は、特に、式(1)で示される別のヌクレオチドホスホルアミグイトを出発物質として用いる従来技術の方法とは異なる。

式(1)における残基Aは、好ましくは、酸素原子保護基である。ヌクレオチド合成において5'-ヒドロキシル基の保護に適している保護基は、公知である。酸性条件下で開裂することができるトリフェニルメチル基またはジメトキシトリフェニルメチル基のような保護基が非常によく用いられる。

残基Aがヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドである場合、それは天然のまたは修飾されたヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのいずれであってもよい。オリゴヌクレオチドを用いる合成はより困難であるので、オリゴヌクレオチドよりもヌクレオチドのほうが好ましい。残基Aのヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、本発明によって製造される残基であってもよい。残基Aの

くはヌクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、 $(n+1)$ 価の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

nは、1~200の自然数である]

で示されるヌクレオチド配列の製造方法を提供するものである。

低級アルキル基および低級アルコキシ基は、酸素原子を1~8個、好ましくは1~4個有する。

いわゆるホスホルアミグイト法による核酸の製造方法は、例えば、ビオシミイ(Biochimie) 1985、

ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの反応性を適当な保護基によって保護するのが好ましい。特に、残基Aのヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの末端の5'-ヒドロキシル基を酸素原子保護基によって保護する。この酸素原子保護基は、特に、残基Aについて上述した定義を有する。

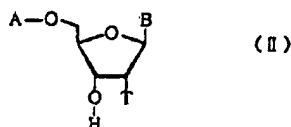
残基Bの天然の核塩基は、好ましくは、アデニン、チミン、シトシン、ウラシルまたはグアニンである。修飾された塩基は、例えば、それらの構造を環または置換基において変化した塩基であってもよい。例えば、7-デアザグアニンまたは5-アミノアルキルウラシルまたは8-アミノヘキシル-アミノ-アデニンが挙げられる。これらの塩基は好ましく、塩基において相補的核酸のWatson-Crick塩基対に全く影響を与えないか、または極僅かだけに影響を与えるだけである。

残基Tは、リボまたはアラビノ配置を有し得る。好ましくは、リボ配置である。塩基性、酸性または求核条件下で開裂することができる基、好ましくは、1-ブチルジメチルシリル基またはトリイ

ソプロピルシリル基は、ヒドロキシ基に関する保護基として使用することができる。

保護基Vは、選択的に開裂し得る保護基であるのが好ましい。完全なヌクレオチド配列を図形担体から開裂する条件下で同時に開裂し得る保護基が好ましい。したがって、例えば残基Aにおいて記載したような酸性条件下で開裂し得る保護基は、好ましくない。故に、アルカリまたはアンモニア条件下で開裂し得る保護基が特に好ましく、フルオレニルメトキシカルボニル基またはトリフルオロアセチル基が特に好都合であることが確認された。

式(I)で示される化合物は、式(II)：

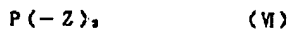


【式中、

Aは、酸素原子保護基、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドであり、

の条件が当業者によって選択され得る。しかし、この方法において、試薬を用いる場合は、保護基Vを開裂し得る試薬を用いないように注意しなければならない。個々の保護基に関するこれらの反応条件は、当業者に知られている。

式(III)で示されるホスファンは、簡単な方法で、市販の入手可能な出発物質から合成され得る。好ましい製造方法において、第2アミンがより安価な粗製物質であるが故に、第2アミンとの反応が最初に計画される。この反応工程において、必要であれば、非特異的な反応による収率の減損は容認し得る。式(III)で示されるホスファンは、好ましくは、式(VI)：



【式中、Zは良好な離脱基である】

で示される化合物と、式(VII)：



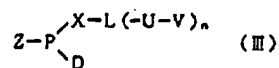
【式中、Dは第2アミン残基である】

で示される第2アミンとを反応させ、得られた生成物を、式(VIII)：

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、(所望により保護された)ヒドロキシ基、低級アルキル基、N、または低級アルキルオキシ基である】

で示される化合物を、式(III)：



【式中、

Zは、良好な離脱基であり、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、少なくとも2箇の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

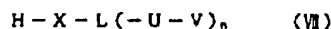
Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1~200の自然数であり、

Dは、第2アミン残基である】

で示されるホスファンと反応させることによって製造することができる。

該反応条件としては、従来技術のヌクレオシドホスホルアミダイトについて既述した条件に類似



【式中、

Xは、酸素原子または硫黄原子であり、

Lは、(n+1)箇の架橋結合基であり、

Uは、酸素原子、硫黄原子、窒素原子またはN-Hであり、

Vは、開裂し得る保護基であり、

nは、1~200の自然数である】

で示される化合物と反応させ、形成された生成物を単離することによって製造される。残基Zは、好ましくはハロゲン原子であり、特に好ましくは塩素原子である。

式(VII)で示される化合物は、特に、式：



【式中、R¹およびR²は、同一または異なっており、1~10個の炭素原子を有する第1、第2または第3アルキル基であるか、または所望により、一緒に、ヘテロ原子として1または2つの窒素原子、酸素原子および/または硫黄原子を含有し得る5~7個の炭素原子を有するアルキル分枝鎖状

シクロアルキル基を示すか、または NR^1R^2 はイミダゾリル基、トリアゾリル基、テトラゾリル基、3-ニトロ-1,2,4-トリアゾリル基、チアゾリル基、ピロリル基、ベンゾトリアゾリル基もしくはベンゾヒドロキシトリアゾリル基である]

で示される、当業者に知られている第2アミンである。ジイソプロピルアミンおよびモルホリンが特に好ましいアミンであることが確認されている。

直鎖状または分枝鎖状の、飽和または不飽和の、炭素原子1~10個、好ましくは2~8個を有する炭化水素は、架橋結合基として有用である。炭化水素鎖は、ヘテロ原子、例えば酸素原子または硫黄原子によって中断されていてもよい。該架橋結合基は、脂肪族環系または芳香族環系を含んでいてもよい。さらに、該架橋結合基は、ヘテロ原子を含んでいてもよい。しかし、本発明方法においてこの架橋結合基を含有する化合物と行われるべき反応に関して、これらの架橋結合基としては、置換基として遊離非置換アミノ基もしくは第1アミノ基またはヒドロキシル基を有するものを除外

在し得る2'-ヒドロキシル基は、1-ブチルジメチルシリル基によって保護されているのが好ましい。遊離ヒドロキシル基は、糖残基の5'-ヒドロキシル基であるのが好ましい。

ヌクレオシドは、モノヌクレオシド、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであってよい。しかし、2~200、好ましくは20~80のヌクレオチドビルディングブロックを有するモノヌクレオシド、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが好ましい。ヌクレオチドビルディングブロックは天然のまたは修飾されたヌクレオチドであってよい。

該ヌクレオシドは、本発明の方法で修飾されたヌクレオシドであってよい。

その後、固相に結合したヌクレオチド配列を酸化する。ヨウ素が好ましい酸化剤であることが確認されている。

次に、キャッピング工程(capping step)を行うのが好ましい。これは公知の方法に従って行われる。

しなければならない。該架橋結合基は、 n 個の共有結合を介して、 n 個の基Uと結合する。 n の数は、1から200までが好ましい。

式(III)で示される化合物は、核酸のホスホルアミダイト合成用のヌクレオシドホスホルアミダイトの合成に用いることができ、かつ保護された形の反応性基を有する、従来技術のホスファンに比べて優れており、これは、検出可能な基に関する結合部位として作用することができる。

ヌクレオチド配列の製造に関する本発明の方法は、特に、下記工程を含む：

式(I)で示されるヌクレオシドホスホルアミダイトと、遊離ヒドロキシル基を有するヌクレオチドとのカップリング反応。遊離ヒドロキシル基を有するヌクレオシドは、固形担体に共有結合されるのが好ましい。アミノ基、カルボニル基または別のヒドロキシル基のようなヌクレオシドの別の反応性基は、カップリング反応の条件下で安定である保護基によって保護されているのが好ましい。糖残基に存

保護基Aまたは残基Aのヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの末端5'-ヒドロキシル基の酸素原子保護基の選択的開裂。好ましい場合において、残基Aの酸素原子保護基が酸性条件下で開裂し得るジメトキシトリフェニルメチル基のような保護基である場合、それは、例えば、ジクロロ酢酸によって開裂され得る。

ここで、所望により、これら第1の工程を繰り返すことができる。これに関して、モノヌクレオシドホスホルアミダイトとして、慣用のモノヌクレオシドホスホルアミダイトまたは式(I)で示されるモノヌクレオシドホスホルアミダイトを用いることができる。

ヌクレオチド配列が所望の長さに達するとすぐに、保護基Vを開裂する。アミノ保護基の場合、トリフルオロアセチルまたはフルオレニルメトキシカルボニル基(Fmoc)が特に優れていることが確認されている。

その後、既知の方法で固形担体からヌクレ

オチド配列を開裂する。この条件は、共有結合のタイプに応じて選択され、本発明の修飾によっては影響されない。

しかし、これらの条件としては、保護基Vの開裂および担体からのヌクレオチド配列の開裂が同時に行われる条件が特に好ましい。これは、例えば、3'-O-スクシニルを介してCPG[制御されたポアガラス(controlled pore glass)]に結合した担体および残基VとしてのFmoc保護基の利用によって行うことができ、これには、開裂試薬として、アルカリ、好ましくは濃アンモニア水溶液またはアミン溶液が用いられる。

通常、次に、精製工程、例えばHPLCクロマトグラフィーまたは/および透析による精製が行われる。一般的にオリゴヌクレオチド合成に用いられるのと同じ条件が適用される。

これら全ての工程は、別のヌクレオシドホスホルアミダイトが用いられ、リン酸エステル残基の

を有する。

例えば、ヌクレオチド配列は、簡単な方法で、検出可能な基または検出可能な基に変化し得る基を有する、本発明方法で製造した式(IX)で示されるヌクレオチド配列から製造することができる。ヌクレオチド配列がいくつかの修飾されたヌクレオチドビルディングブロックを有する場合、このような基をいくつか含有するヌクレオチド配列を製造することができる。結果として、核酸の測定がより高感度になることが確認されており、このために、この方法は好ましい。

さらに、本発明は、上記工程の後に、形成された式(IX)で示されるヌクレオチド配列と式(IV)：



[式中、

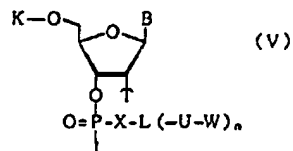
Yは、反応性基であり、

Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化し得る基である]

で示される化合物とを反応させることからなる、式(V)：

酸素原子保護基を開裂するための試薬の代わりに保護基Vの開裂用の既存の試薬が用いられるという事は別にして、この方法の慣用の反応経路の変化を必要としないという共通点を有する。特に、工程の数は、慣用のホスホルアミダイト法と同じであるかまたはそれよりも少ない。すなわち、本発明の方法は、装置を変えずに、ホスホルアミダイト合成用の入手可能な核酸合成器で行うことができる。

この方法で製造される式(IX)で示されるヌクレオチド配列は、好ましくは2~200、特に好ましくは20~60のヌクレオチドビルディングブロックを有する。ヌクレオチドビルディングブロックの10~80%、特に好ましくは20~50%は、リン原子の位置で修飾された式(I)で示されるヌクレオシド-リン酸から形成されたヌクレオチドビルディングブロックである。これらの修飾されたヌクレオチドビルディングブロックは、配列中で互いに2~5ヌクレオチド間隔であるのが好ましい。式(IX)で示される化合物は多くの用途



[式中、

Kは、水素原子、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列のリン酸エステル残基のリン原子であり、

Jは、ヒドロキシル基、または別のヌクレオチドもしくはヌクレオチド配列の5'位の酸素原子であり、

Bは、天然のまたは修飾された核塩基であり、

Tは、水素原子、低級アルキル基、アジド基、低級アルキルオキシ基またはヒドロキシル基であり、

Wは、検出可能な基または検出可能な基に変化し得る基であり、

X、L、Uおよびnは前記定義と同じである]で示されるヌクレオチド配列の製造方法を提供するものである。

容易に置換することができる求核基、または求電子基は、例えば、反応性基Yとして使用することができる。式(IV)で示される化合物は、例えば、カルボン酸ハロゲン化物である。

求電子基は、例えば、活性化エステルまたは無水物中の基である。これらがカルボキシル基である場合、好ましいエステルは、例えば、ハブテンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルである。

残基KまたはJの定義に含まれる別のヌクレオチドは、天然のまたは修飾されたヌクレオチドであってよい。残基KまたはJの定義に含まれるヌクレオチド配列は、天然のおよび修飾されたヌクレオチドビルディングブロックを含有し得る。式(V)で示されるヌクレオチド配列は、好ましくは2~200、特に好ましくは20~80のヌクレオチドビルディングブロックを有する。ヌクレオチドビルディングブロックの10~80%、特に好ましくは20~50%は、式(1)で示されるヌクレオシド-リン酸から形成されたヌクレオチドビルディングブロックである。

によってプライマーとして受け入れられる。

修飾は、例えば糖残基もしくは塩基の別の修飾、または3'-もしくは5'-末端標識に付加的に生じる。

該方法は、必要なビルディングブロックの集中合成(convergent synthesis)を含む。このような方法は、特に高価なヌクレオチドビルディングブロックの収率を高く維持することができるので、特に優れている。

容易に入手でき、自然に生じるβヌクレオシドをヌクレオシドホスホルアミダイトの合成に用いることができる。

リン酸エステル基の位置で修飾されたヌクレオチド配列を合成するために、同一または減少した反応工程の数と共に、ヌクレオチド配列の合成のための固相ホスホルアミダイト法の周知の長所を利用することができた。

本発明の方法を用いて、配列における全く特定の部位で非常に特定数の修飾を導入することができる。

残基Wは、低分子標識および高分子標識であってよい。好ましい低分子のレポーター分子は色素およびハブテンであり；好ましい高分子群は、例えば、酵素、または抗原もしくは抗体のような免疫学的に活性な物質である。特に好ましくは、ハブテンである。例えば、ジゴキシゲニンのような体液中で通常の条件下では生じないものが特に好ましい。ハブテンおよび特に好ましいジゴキシゲニンは、これらを有するヌクレオチド配列の分子量が修飾によってあまり変化せず、例えばゲルクロマトグラフィーにおいて、長さの標識として用いることができるので、免疫学的に活性な物質として特に優れていることが確認されている。

さらに、ヌクレオチド配列の標識に関する本発明方法は、従来技術と比較して以下の優れた点を有していることがわかった：

修飾がリン原子の位置で生じるので、相補的ヌクレオチド配列と共に形成されたヌクレオチド配列の塩基対は損なわれない。

形成されたヌクレオチド配列はポリメラーゼ

一般に、形成された修飾されたヌクレオチド配列を用いることができる。例えば、異なる検出可能な基を選択することができる。

検出可能な基がヌクレオシドホスホルアミダイトに最初から存在しないので、酵素標識または別の感受性レポーター基を用いる場合に予想されるヌクレオチドの化学合成の間の複雑化が回避される。

レポーター分子による立体障害は、オリゴヌクレオチド合成の収率および効率を減少することがある。この欠点は、本発明の方法で回避される。

試料中の核酸に本質的に相補的である核酸と試料との接触、他方に相補的である核酸のハイブリダイゼーションを生起させる条件下での該混合物の処理および検出可能な基の検出による試料中の核酸の検出方法において、式(V)で示されるヌクレオチド配列は、試料DNAに相補的なヌクレオチド配列として好都合に用いることができる。検出可能な基の検出は、既知の方法によって行うこ

とができる。検出可能な基が免疫学的に活性な物質である場合、該基は、標識化された免疫学的パートナーと反応し得る。その後、標識を測定する。本発明の核酸利用の場合、基Wとして、ハプテン、特にジゴキシゲニンが好ましい。

これらは、一重鎖核酸から二重鎖核酸への酵素的合成におけるプライマーとして同等に好適である。形成された二重鎖核酸は、2つの鎖のうちいずれか一方にスクレオチド配列を含有している。

(実施例)

以下の実施例によって、本発明を説明する。

実施例 1

2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエタノール

容量1ℓの丸底フラスコ中、撹拌しながら、ジオキサン300ℓに9-フルオレニルメトキシカルボニル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル($Fmoc-O-Su$)68.0g(約200ミリモル)を溶解した。該透明溶液に、水200ℓに溶解した Na_2CO_3 40gおよびエタノールアミン14.

内で滴下し、温度を約 $-80 \sim -85^\circ C$ に維持した。添加終了後、濃いパルプ状反応混合液を室温にし、無水エーテル約600ℓで希釈して、さらに撹拌し易くした。室温でさらに3時間撹拌した後、形成した沈殿物をガラスフィルターで吸引濾過し、エーテルで数回洗浄した。常圧でエーテルを排水した後、水流ポンプ(water-jet vacuum)で未反応PCl₅、ジイソプロピルアミンおよびピリジンを除去し、次いで、残存した油状物をオイル-ポンプバキューム(oil-pump vacuum)($K_0.48^\circ C / 0.35 Torr$)で分別蒸留した。理論収量の36%に相当するホスファン73.4gを得た。

^1H-NMR (ppm) ($CHCl_3$): 1.67.5.

実施例 3

2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエチル-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスホクロリグイト

容量100ℓの丸底フラスコ中、無水テトラヒドロフラン30ℓにジクロロ-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスファン0.9ℓ(5ミリモル)

4ℓ(238ミリモル)を連続して添加した。すぐに形成したパルプ状(pulpy)反応混合液を、室温で一晩撹拌し、翌日、吸引濾過した。未反応の $Fmoc-O-Su$ 、N-ヒドロキシスクシンイミドおよび目的生成物を含有する濾過残渣を酢酸エステルから再結晶した。減圧乾燥した後、純な生成物47.4g(理論収量の76%)を得た。

^1H-NMR (ppm) ($DMSO$): 3.4($m, CH_2O, 2H$); 3.6($t, CH_2N, 2H$); 4.2-4.5($m, CH_2OCO + H [C9], 2H$); 5.2($s [b], NH, 1H$); 7.2-7.9(m , 芳香族, 8H).

実施例 2

ジクロロ-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスファン

容量500ℓの滴下漏斗、KPGスターラー、温度計およびアセトン/ドライアイス浴を装備した容量2ℓの3つ口丸底フラスコ中、撹拌しながら、無水エーテル300ℓ、無水ピリジン81ℓおよびPCl₅87.5ℓ(1モル)を $-70^\circ C$ に予め冷却した。それに無水エーテル250ℓ中ジイソプロピルアミン142ℓ(1モル)を、2時間以

て溶解し、これに無水ピリジン0.4ℓを添加した。磁気的に撹拌しながら、この混合液に、無水テトラヒドロフラン20ℓに2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエタノール(5ミリモル)1.4gを溶解した溶液を、約5時間、ゆっくりと滴下した。テトラヒドロフランを分離および排水したピリジン・塩酸塩を吸引濾過した後、残存した油状物(2.2g-理論収量の98%)を、スクレオシドホスホルアミグイトの製造に直接用いた(実施例4参照)。

実施例 4

5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシチミジン-3'-O-[2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエチル]-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスファン

a) 容量100ℓの丸底フラスコ中、ジクロロメタン(Na_2CO_3 で蒸留した)50ℓおよびN-エチル-N,N-ジイソプロピルアミン2.5ℓに5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシチミジン2.5g(4.6ミリモル)を溶解した。使い

捨て注射器を用いて、これに2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエチル-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスホクロリダイト2 μ l(約5ミリモル)を加えた。室温で48時間攪拌し、減圧下で蒸発させ、粘濁性の残留物を得た。

粗生成物をシリカゲル60[カラム30 \times 2cm、移動溶媒：石油エーテル50 \sim 70 $^{\circ}$ C/酢酸エチル/ジクロロメタン/ピリジン(4:8:8:2)]によるクロマトグラフィーによって精製した。生成物を含有する画分を集め、溶媒を完全に減圧除去した。

理論収量の20%に相当する白色の泡状残留物0.9gを得た。

b) 別法として、攪拌しながら、無水ジオキサン100 μ lに5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシチミジン5.45g(10ミリモル)を溶解した。この溶液に、ハンモト(S. Hamoto)、クカク(H. Takaku)[ケミストリー・レターズ(Chemistry Letters), 1986, 1401-1404]に従って調製したビス-(ジイソプロピルアミノ)-クロロホスファ

去した後、濾液を濃縮した。粗生成物を、シリカゲル60H($\ell=2.4$ cm, $d=4$ cm; 移動溶媒：塩化メチレン/酢酸エチル(5:1))によるクロマトグラフィーによって精製した。溶媒の除去後、無色の泡状物を再度得た。これを塩化メチレン10 μ l中に取り、氷冷したn-ヘキサン400 μ lによって沈殿させた。理論収量の20%に相当する無色粉末の目的生成物1.8gを得た。

2つのジアステレオマーは、TLCおよび 31 P-NMRによって識別することができる。

Rf値($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EA}=1:1$): 0.04, 0.15。

^31P -NMR(ppm)(CD_3CN): 146.7, 145.8。

実施例5

d(TpApTpTpTpTpTpTpApT)の合成

オリゴヌクレオチドの合成は、バイオサーチ・カンパニー(BioSearch Company)から入手した完全自動DNAシンセサイザー8600において標準的なプロトコールに従って1マイクロモルの大きさで行った。合成装置は、1マイクロモルのチミジン塩基で被覆された反応カラムを装着してお

し2.7g(10ミリモル)、およびトリエチルアミン2.1 μ l(15ミリモル)をジオキサン100 μ lに溶解した溶液を、30分以内で滴下した。反応の後、移動溶媒として塩化メチレン/酢酸エチル(1:1)を用いる薄層クロマトグラフィーにかけた。2時間後、保護アルゴンガス(protective gas argon)の存在下、塩化トリエチルアンモニウム(無色の泡状物)を濾去し、濾液を濃縮した(無色の泡状物)。さらに単離せずに、形成された5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシチミジン-3'-O-ビス-(N,N-ジイソプロピルアミノ)ホスファンを目的生成物に転換した。これについては、無色の泡状物を無水アセトニトリル100 μ l中に取り、2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエタノール(実施例1)3gおよびテトラゾール(昇華した)35 μ g(5ミリモル)を添加した。室温で一晩攪拌し、酢酸エチル100 μ lの添加によって、反応を停止した。塩化ナトリウム飽和水溶液で3回抽出した後、合わせた有機相を硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムを濾

り、第1反応工程において、ジクロロメタン中2%ジクロロ酢酸溶液で処理して、5'-OH保護基(ジメトキシトリチル)を開裂させた。該カラムをアセトニトリルで洗浄した後、本発明に従ってP原子の位置で修飾された実施例4の5'-O-ジメトキシトリフェニルメチル-2'-デオキシチミジン-3'-O-[2-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノエチル]-N,N-ジイソプロピルアミノ-ホスファンと、出発ヌクレオシドの遊離5'-OH基とをカップリングし、同時に、アセトニトリル中でテトラゾールによって活性化した。3個の形で存在したままであるP原子を、洗浄を繰り返した後、THF/ルチジン/ H_2O にヨウ素を溶解した溶液で酸化することによって、天然の5個のリン酸エステルに転換した。次の無水酢酸/ジメチルアミノピリジンによるカップリング工程によって、アセチル化による非-結合の5'-OH-ヌクレオシドを保護した。この方法によって、正しくない配列の形成が抑制された。洗浄後、5'-O-ジメトキシトリチル

保護基を繰り返し開裂することによって出発から合成サイクルを再開した。この方法で、最終段階におけるアミノエチル化チミジン-ホスホルアミダイト(Tpaz)とさらにカップリングを行う前に、非修飾ホスホルアミダイト分子を有する8チミジンビルディングブロックを反応配列に導入した。合成終了後、担体に結合したオリゴヌクレオチドを、濃アンモニア水溶液による処理によって解放し、これによって、同時にアミノエチル化リン酸エステルのFmoc保護基が除去された。結果は、86 ODU/A_{...}であった。この粗製混合物を以下の条件下でHPLCにかけた。

カラム：モノ(Mono)Q HR 10/10 [ファーマシア(Pharmacia)]。

溶離液A：水。

溶離液B：0.5N LiCl。

勾配液：80分間でAから50% Bまで。

溶出液をH₂Oに対して一晚透析した[スペクトレーパー(Spectrapor)、MWCO 1000]。

収量：55 ODU。

水中に取り、蒸留水に対して一晚透析した[スペクトレーパー(Spectrapor)、MWCO 1000]。

収量：11 ODU/A_{...}。

実施例7

DNA試験における検出限界の比較

HIVに対して特異的な配列を有する3つの同一のオリゴヌクレオチド(3 B mere)のハイブリダイゼーション特性を、クローンしたHIV-DNAフラグメント(HIV-Wfl. 13-アイソレートのgag領域由来の954bp PvuII/BglIIフラグメント)に対して試験した。オリゴヌクレオチドの下記部位を、ジギキシゲニンで標識化した：

1. それぞれ、5'-末端ウラシルおよび中央部に位置するウラシル(すなわち、2つのディグ標識(dig labels)、ウラシルのC-5での塩基標識)。
2. それぞれ、5'-末端、3'-末端および中央部に位置するウラシル(すなわち、3倍のディグ標識、ウラシルのC-5での塩基標識)。

実施例8

ジギキシゲニンによる実施例5からのオリゴヌクレオチドの標識化

0.1M酢酸ナトリウム緩衝液1M(pH 8.5)に実施例5からのオリゴマー55 ODU/A_{...}を溶解し、ジメチルホルムアミド1Mにジギキシゲニン-O-スクシニル-アミドカプロン酸-N-ヒドロキシスクシニミドエステル10mgを溶解した溶液と混合した。この混合液を室温で18時間攪拌し、減圧下で蒸発乾固し、H₂Oに溶解し、生成物を含有する混合液を以下のHPLCで分離した：

カラム：シャンドン・ハイパーシル(Shandon Hypersil) ODS、25cm×0.4cm。

溶離液A：0.1M酢酸トリエチルアンモニウム溶液。

溶離液B：0.1M酢酸トリエチルアンモニウム溶液/イソプロパノール。

勾配液：30分間かけてAから50% Bまで。

生成物成分を、減圧下で蒸発によって濃縮し、

3. それぞれ、5'-末端リン酸エステル残基および中央部に位置するリン酸エステル残基(本発明に従って標識する、2つのディグ標識/分子)。

a)ディグ標識を有するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション調製法

試料DNAを1μlの容量ずつ一連の希釈系にフィルター上で直接スポットするか、または、アガロースゲル中で分離した後、フィルター上に、20xSSC緩衝液を用いるサザンブロットによって移した。3分間、UV照射によって固定化を行った。

フィルターを以下の条件下で予めハイブリダイズした：5xSSC中、40℃で1時間、0.5%保護試薬。以下の条件下で、ディグ標識化したオリゴヌクレオチドとの次のハイブリダイゼーションを行った：5xSSC中、4℃で一晚、0.5%保護試薬、ハイブリダイゼーション溶液1Mあたりオリゴヌクレオチド200ng。

次いで、フィルターを、2xSSC、0.1%

SDS中、40℃で10分間、4回洗浄した。

リボキシゲニンに対するPOD-標識化抗体を用いて、非放射性標識化および検出装置[ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング(Boehringer Mannheim GmbH)]に類似の検出を行った。

b)結果

スポット/プロットされた試料DNAの検出限界は、

(1)2倍塩基標識化オリゴヌクレオチドで10 ng、

(2)3倍塩基標識化オリゴヌクレオチドで10 ng、

(3)リン酸エステルによって2倍標識化されたオリゴヌクレオチドで1~10 ngであった。

特許出願人 ベーリンガー・マンハイム・ゲゼル
シャフト・ミット・ベシュレンクテル・
ハフツング

代理人 弁理士 青山 森 ほか1名

第1頁の続き

- | | | |
|------|------------------|--------------------------------------|
| ⑫発明者 | クラウス・ミューレゲル | ドイツ連邦共和国8121ボリンク、レーメルストラーセ7番 |
| ⑬発明者 | ヘルベルト・フォン・デル・エルツ | ドイツ連邦共和国8120バイルハイム、イン・デル・アウ21番 |
| ⑭発明者 | ハンスーゲオルグ・パツ | ドイツ連邦共和国8132トゥーツィンク、トラウビンゲルーストラーセ63番 |